

分担研究報告書

平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金「重症のインフルエンザによる肺炎・脳症診断・治療に関する研究：新規診断・治療に関する提案と検証」

分担研究報告書

重症化モデル動物実験によるインフルエンザ肺炎・脳症診断・治療に関する研究：
新規診断・治療に関する提案と検証

研究分担者 木戸博（徳島大学疾患酵素学研究センター 特任教授）
研究協力者 高橋悦久（徳島大学疾患酵素学研究センター 特任助教）
山根一彦（徳島大学疾患酵素学研究センター 大学院生）
Irene Lorinda Indalao（徳島大学疾患酵素学研究センター 大学院生）
榎本奈緒子（徳島大学疾患酵素学研究センター 研究員）

研究要旨

インフルエンザ重症化(肺炎、脳症)発症機序の解明、重症化を早期に診断するためのバイオマーカー、Flu Alarmin の検索、重症化治療薬の検索について、昨年に続いて解析が行われ、これまで提唱してきた「インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼ (Trypsin, MMP-9)」サイクルに共役する「体内代謝障害 サイトカイン」サイクルが確認され、重症化阻止の戦略が明確になった。体内代謝障害の中でも、生命活動に直結しているエネルギー代謝の中で、特に Pyruvate Dehydrogenase と Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4 (PDK4) がサイトカインと密接に関係しており、PDK4 阻害剤の治療効果が確認された。抗インフルエンザ薬とこの PDK4 阻害剤の併用で、半数致死量の 20 倍の極めて高濃度のウイルス感染でも生存率 100%が達成され、その治療効果が注目された。昨年報告した PDK4 阻害剤の Diisopropylamine Dichloroacetate 以外のより強力な PDK4 阻害剤がスクリーニングされ、有望な新規化合物が数種同定された。

従来インフルエンザ脳症リスク因子として、熱不安定性 Carnitine Palmitoyltransferase II (CPT II) 遺伝子多型を見出してきた。インフルエンザ脳症が当初日本人種に特徴的と言われてきたが、大規模な遺伝子解析と脳症調査が中国で我々との共同研究で実施され、熱不安定性 CPT II と脳症との関係が海外でも確認された。この事から熱不安定性 CPT II によるインフルエンザ脳症は、東アジア人種に共通する疾患と考えられた。さらに、全血を用いて診療の現場で熱不安定性 CPT II SNP を 30-40 分以内に診断する方法として、理化学研究所が開発した SMART AMP 法を用いて検証することで、実用化が可能と判定された。

A. 研究目的

重症インフルエンザ感染による肺炎・脳症・心筋炎の主要な病因は、血管内皮細胞障

害による血管透過性亢進と多臓器不全にある。発症機序として、これまでに本研究グループでは「インフルエンザ サイトカイン

プロテアーゼ”ウイルス増殖サイクルを見出し、さらに昨年度の研究によりウイルス増殖サイクルと重症化の発症を結びつける“サイトカイン-代謝不全”サイクルを見出した。図1に示す2つのサイクルがサイトカインを介して共役したときに重症化が発症すると考えられることから、早期重症化診断と治療に関する検討を実施した。昨年までの研究から、エネルギー代謝を改善する図2に示す Pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) 阻害剤がこの2つのサイクルを効果的に阻害して、サイトカインストームを治療すると共に、“インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼ”ウイルス増殖サイクルを抑制することが判明している。これらを基盤に、①抗インフルエンザ薬のタミフルと PDK4 阻害剤の diisopropylamine Dichloroacetate (DADA) との併用効果を検討した。② DADA は肝臓保護薬として約50年前から使用されてきた既存薬であるが、DADA より強力な PDK4 阻害剤の検索を実施した。③小児のインフルエンザ重症化にインフルエンザ脳症がある。この疾患が日本で最初に発見されたことから、従来日本人に特有な疾患として位置付けられてきた。しかし、この疾患の発症リスク因子として、ミトコンドリアの脂肪酸代謝酵素の Carnitine Palmitoyltransferase (CPT II) の熱不安定性 SNP が原因であることを突き止めたことから、日本人に特徴的な疾患では無く、東アジア人種の CPT II SNP を背景とする可能性が考えられた。そこで、中国人でのインフルエンザ脳症の発症と、CPT II SNP を調査した。④インフルエンザ脳症は、脳の血管内皮細胞の機能不全が病気の本態であると推定されるため、機能不全になる前に早期に診断して治療に着手する必要がある。そこで、高熱が持続することで障害の起きやすい患者に、診療の現場で熱不安定性

CPT II SNP を調べる方法の開発に取り組んだ。

B. 研究方法

マウスの重症化モデル動物実験では、重症化しやすい離乳期直後の3週齢マウス (C57BL/6CrSlcまたは、BALB/c) 雌を用いて実験した。インフルエンザウイルス株によって感染重症化の程度が異なるため、重症化しやすい Influenza A/PR/8/34(H1N1) 株を用いた。なお、タミフルと DADA との併用実験では、半数致死量の20倍を示す極めて高濃度のウイルスの経鼻投与で検討した。

DADA より強力な PDK4 阻害剤の検索では、北里大学生命科学研究所の創薬ライブラリーを動員して、北里大学生命科学研究所が共同で実施した。中国のインフルエンザ脳症患者の Fibroblast を用いた熱不安定性 CPT II SNP の性状解析は、南通医学院との共同研究として実施された。

(倫理面への配慮)

動物実験に当たっては、徳島大学動物実験委員会の承認を得て、動物実験ガイドラインに沿って実施した。

C. 研究結果

①抗インフルエンザ薬のタミフルと DADA との併用によるインフルエンザ感染重症化の阻止効果

インフルエンザ感染後の生体応答として各種サイトカインの誘導が感染2-3日目より生じ、生体防御系としての液性免疫誘導が感染4日目より開始されるが、代謝不全が明らかになる時期は感染7日目前後で、この時期から個体の死亡が出始める。図3は、半数致死量の20倍量、致死量120 PFUの10倍量の高濃度ウイルス(1200 PFU)を経鼻感染させて DADA の効果を検討した。この過酷な感染条件でも DADA 単独で生存率50%が得られた。また

この条件でヒト治療量のタミフル (10 mg/kg/day) はマウスに対して生存率 70%を示したが、タミフルの量を増やしてもさらなる効果は期待できなかった (data not shown)。この条件下で、タミフルと DADA を併用するとマウスの生存率は 100%を達成した。なお、タミフルと DADA の併用療法は、感染初日から投与した時の効果を示しており、できるだけ早期の治療開始が好ましいと推定された。

新規 PDK4 阻害剤のスクリーニング

DADA は、PDK4 に対して $IC_{50} = 50.9 \mu\text{M}$ を示し、類似アイソマーの PDK2 には $IC_{50} = 636.0 \mu\text{M}$ を示して、PDK4 に対する高い特異性を示した。これらの値は、従来 PDK 阻害剤として知られていた Dichloroacetate (DCA) の示す $IC_{50} = 57.8 \mu\text{M}$ (PDK4)、 $IC_{50} = 676.0 \mu\text{M}$ (PDK2) とほぼ同等の阻害効果と考えられる。そこで、これまでに報告されている PDK4 の X 線結晶構造解析データから、活性中心の立体構造と ATP 結合部位の構造を参考に、活性中心部位に入りうる化合物のサイズを推定して、Protein Kinase 阻害剤とその類縁体をスクリーニングして、誘導体作成に適したリード化合物をスクリーニングした。毒性が低くより強い PDK4 阻害活性を示す 4 種の化合物が選択されたが、これらの中で、各種誘導体の作成に有利な KIS-012 (Vit K3) を選択して、各種誘導体の作成を実施し、DADA の約 100 倍強力な PDK4 新規阻害剤を数種類見出すことに成功した。

中国人におけるインフルエンザ脳症のリスク因子、熱不安定性 CPT II SNP の再現性の検証

インフルエンザ脳症は日本で最初に発見されたことから、日本人に特有な疾患として位置付けられてきた。しかし、この疾患の発

症リスク因子として、ミトコンドリアの脂肪酸代謝酵素の Carnitine Palmitoyl-transferase (CPT II) の熱不安定性 SNP が原因であることを我々が突き止めたことから、東アジア人種に特徴的な疾患の可能性を推定して、詳細な検討を中国で実施した。中国、南通医学院でインフルエンザ脳症と診断された 12 名の患者の白血球から、遺伝子診断でこれまでに日本で報告されていた 3 型の CPT II SNP を確認できた。具体的には、[c.1102 G>A (p.V368I)] (heterozygous)、[c.1102 G>A (p.V368I)] (homozygous)、[c.1055T>G (p.F352C)] (heterozygous)+ [c.1102 G>A (p.V368I)] (homozygous) の 3 型であった。患者のファイブプロラストを用いて、酵素の熱不安定性、細胞内 Half-life、ミトコンドリアでの β -酸化と ATP 産生量の測定を実施した。

その結果、図 5 に示すように、F352C (heterozygous) + V368I (homozygous) では、 37°C では Control の wild type に比較して約 63% に酵素活性は減少し、さらに 41°C の高熱条件下では、32% に減少した。V368I (homozygous)、V368I (heterozygous) では、 37°C において wild type (WT) に比較して有意な減少は観察されず、 41°C の高熱条件下で僅かに減少して約 82% を示した。以上のことから、F352C (heterozygous) + V368I (homozygous) の熱不安定性 SNP が確認された。さらに、細胞内の蛋白を [^{35}S]-methionine で 2 時間 Pulse ラベルした後、細胞を洗浄して Chase 実験を実施した。図 6 に示すように、WT CPT II は half-life=18 時間を示したが、V368I (homozygous) は 10 時間を、F352C (heterozygous) + V368I (homozygous) の half-life は 4 時間を示した。このような状況下における細胞内ミトコンドリアの β 酸化と ATP 産生レベルを測定した結果を図 7 に示

す。F352C (heterozygous) + V368I (homozygous)では、 β 酸化とATP 産生レベルは共に 37 °C で WT の 75%を、41 °C で WT の 52%を示した。ATP レベルは、40-50%以下で致命的であり、F352C (heterozygous) + V368I (homozygous)の SNP を持つ細胞では 41 °C の条件下では危険な状態にあることが判る。

④ CPT II SNP の迅速診断

CPT II の熱不安定性に係わる因子は、図 5、6、7 に示すように、F352C であることから、F352C (heterozygous)、F352C (homozygous)と WT を迅速に外来で判定する方法の開発を検討した。これまでに理化学研究所では、全血を用いて DNA の抽出操作なしに 30-40 分以内に遺伝子増幅する SMART AMP システムを開発している。そこで本プロジェクトではこの迅速性と簡易性に注目して、F352C の遺伝子解析を SMART AMP システムで検討した。図 8 に示すように、F352C と F352C の homozygous と heterozygous を 30-40 分以内に解析が可能であることが確認された。

D. 考察

平成 26 年度の研究により、サイトカインを介して共役する“インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼ”サイクルと“サイトカイン 代謝不全”サイクルが、重症化発症の主要な原因であることが確認され、治療薬として PDK4 阻害剤の DADA を介する糖代謝の改善、CPTII 発現を促進する Bezafibrate による長鎖脂肪酸代謝の改善が、有効であることが確認された。これらを基盤に、抗インフルエンザ薬と DADA の併用効果が検討され、感染早期からの両薬剤の併用で著明な重症化阻止効果を示すことが判明した。

さらに小児のインフルエンザ重症化の代

表的疾患であるインフルエンザ脳症において、日本人種に特徴的な疾患といわれていたが、この疾患の発症原因が CPT II の熱不安定性 SNP にあることを、中国人のインフルエンザ脳症患者でも確認することができた。

インフルエンザ脳症は、脳の血管肺皮細胞の血液脳関門が開いてからでは治療が困難になるため、早期の診断が重要である。そこで外来でインフルエンザ脳症のリスク因子の熱不安定性 SNP、F352C を患者の全血で 30-40 分以内に診断する方法を明らかにしており、今後の医療現場での応用が期待される。

E. 結論

インフルエンザ感染重症化機序として、「インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼサイクルにカップルしたサイトカインー代謝不全サイクル」が確認された。このネットワーク機構の中で、抗インフルエンザ薬と糖代謝不全の治療薬の DADA との併用による著明な治療効果が確認された。

従来インフルエンザ重症化の発症リスク因子として見出していた CPT II の熱不安定性 SNP が、中国のインフルエンザ脳症患者でも共通して見いだされたことから、東アジア人種に共通したリスク因子になることを確認し、その迅速診断法を確立した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Min Yao, Min Cai, Dengfu Yao, Xi Xu, Rongrong Yang, Yuting Li, Yuanyuan Zhang, Hiroshi Kido, Dengbing Yao. Abbreviated half-lives and impaired fuel utilization in carnitine

- palmitoyltransferase II variant fibroblasts. *PLoS ONE*, 2015; 10(3), e0119936.
- (2) Toshihiro Maekawa, Takashi Kimoto, Dai Mizuno, Yuichi Furukawa, Masayuki Ida, Etsuhisa Takahashi, Takayuki Izumo, Yoshiko Ono, Hiroshi Shibata, Hiroshi Kido. Oral administration of lactobacillus pentosus strain S-PT84 enhances anti-influenza virus specific IgG production in plasma after limited doses of influenza virus vaccination in mice. *J Vaccine Immuno* 2015; 2(1):5.
- (3) Mineyoshi Hiyoshi, Irene L Indalao, Mihiro Yana, Kazuhiko Yamane, Etsuhisa Takahashi, Hiroshi Kido. Influenza A virus infection of vascular endothelial cells induces GSK-3 β -mediated β -catenin degradation in adherens junctions, with a resultant increase in membrane permeability. *Arch Virol* 2015; 160: 225-234.
- (4) Hai-Yan Pan, Hua-Mei Sun, Lu-Jing Xue, Min Pan, Yi-Ping Wang, Hiroshi Kido, Jian-Hua Zhu. Ectopic trypsin in the myocardium promotes dilated cardiomyopathy after influenza A virus infection. *Am J Physiol Circ Physiol* 2014; 307: H922-H932.
- (5) Yamane K, Indalao IL, Yamamoto Y, Hanawa M, Kido H. Diisopropylamine dichloroacetate, a novel pyruvate dehydrogenase kinase 4 inhibitor, as a potential therapeutic agent for multiorgan failure in severe influenza. *PLoS ONE*, 2014; 9(5): e98032.
- (6) 木戸博, インフルエンザ感染症の予防と治療に関する新展開 インフルエンザ 2014; 16(2): 5-6.
- (7) 木戸博 インフルエンザ脳症とCPT-II 熱不安定性遺伝子多型 クリニシアン 2014; 61(634): 13-16.
- (8) 木戸博 インフルエンザ感染症の重症化メカニズム *J Otolaryngo Head Neck Surgery* 2014; 30(11): 1540-1544.
- (9) 木戸博 インフルエンザ感染の重症化機序、肺炎・脳症の最新知見と治療法の提案 *都耳鼻会報* 2014; 143: 41-46.
2. 学会発表
- (1) Indalao IL, Yanmane K, Kido H. PDK4 inhibitor suppresses cytokine storm and multiple organ failure induced by lethal doses of influenza A virus infection through restoration of energy metabolic disorder. 第87回日本生化学会大会。平成26年10月15日 10月18日(京都国際会議場)
- (2) Indalao IL, Yanmane K, Kido H. インフルエンザウイルスの体内複製を増強する trypsin の臓器内発現量は「代謝障害 サイトカイン」サイクルの調節下にある:PDK4 阻害剤の有効性 第19回日本病態プロテアーゼ学会学術集会。平成26年8月8日 8月9日(千里ライフサイエンスセンター)
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)
該当なし。

重症化治療の 新展開 : 予防と治療の可能性		
薬剤	主な作用	重症化: 代謝破綻・ATPクライシス/ 血管透過性亢進/細胞結合崩壊等
<ul style="list-style-type: none"> • アプロチニン (牛肺由来: BAYER) トリプシン阻害 • ジクロロ酢酸 PDK4阻害 ジソプロピルアミン(DADA) (サイトカインストームの治療薬) Vit B15 • ベザフィブレート CPT II 転写促進 • 70%炭水化物/中鎖脂肪酸ミルク • 解熱 (一部解熱剤は不可) • クラリスロマイシン MMP-9発現抑制 	<ul style="list-style-type: none"> • クラリスロマイシン 再感染抑制 (粘膜免疫増強) 	<p>プロテアーゼ: トリプシン↑ MMP-9↑</p> <p>PDK4↑ ↓ 糖代謝抑制 /ATPクライシス 脂肪酸代謝抑制</p> <p>•血管内皮細胞障害 •多臓器不全 •熱による後天性 (エネルギー代謝不全) CPTII欠損症状態</p>
<ul style="list-style-type: none"> • クラリスロマイシン 再感染抑制 ⇒ 重症化抑制(症状改善) (粘膜免疫増強) 再感染予防 		

図1. 感染重症化のカスケードを構成する“インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼ”サイクルにカップルした“サイトカイン-代謝不全サイクル”

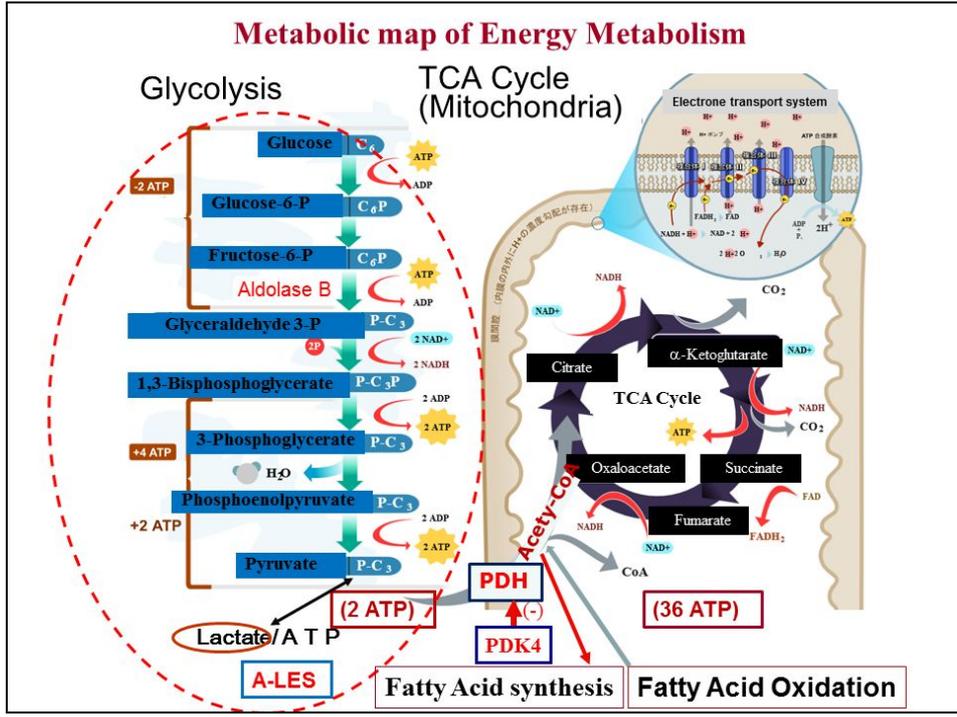


図2. エネルギー産生系と PDH、PDK4

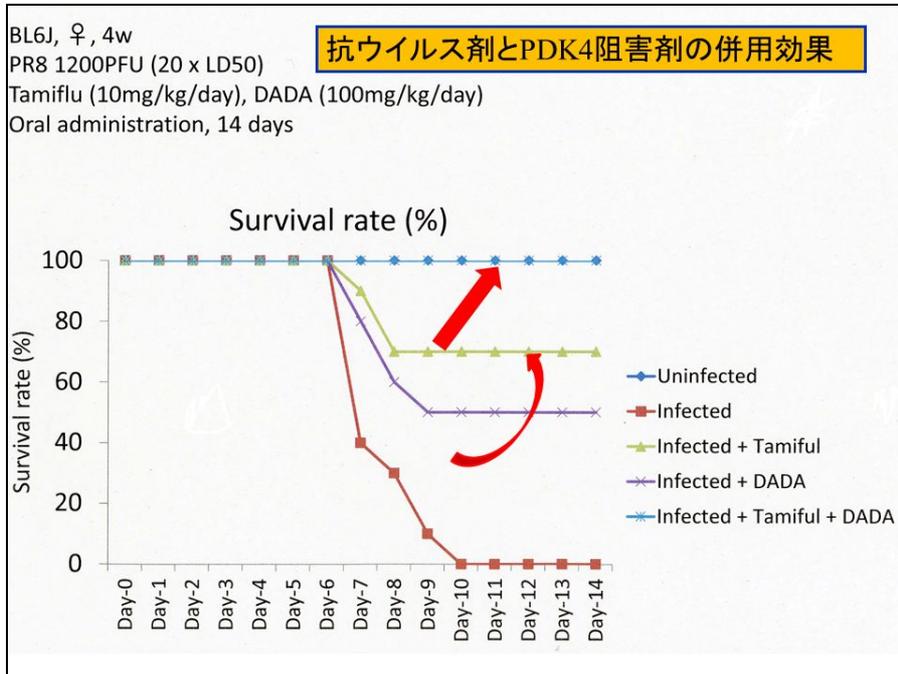


図 3 . 20 × LD50=1200 pfu の高濃度インフルエンザ感染に対する抗インフルエンザ薬 Tamiflu と糖代謝改善薬 DADA の単独効果と併用効果

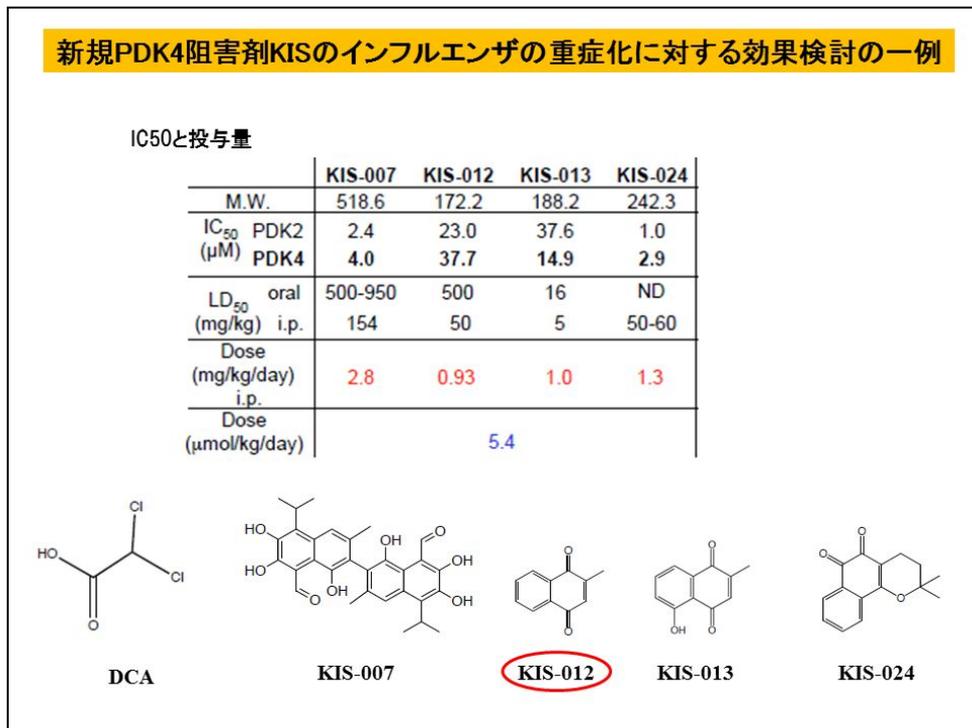


図 3 . PDK4 の活性中心立体構造に結合可能な新規 PDK4 阻害剤開発のためのリード化合物